

RIDA® GENE Bordetella

REF PG2505



1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Bordetella é uma PCR multiplex em tempo real para a detecção direta e qualitativa, e diferenciação de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii* de zaragatoas e lavados nasofaríngeos em humanos. A PCR multiplex em tempo real RIDA®GENE Bordetella destina-se a ser usado como um auxílio no diagnóstico de coqueluche causada por *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii*, respectivamente.

2. Sumário e explicação do teste

Bordetella pertussis é uma bactéria gram-negativa que provoca uma infecção respiratória aguda denominada coqueluche ou pertússis. *Bordetella holmesii*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella bronchiseptica* provocam menos comumente um doença parecida à coqueluche que, geralmente, é mais suave. A coqueluche pode provocar uma doença grave em pessoas de todas as faixas etárias, e que pode ser fatal principalmente em lactentes. A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que, em 2008, houve cerca de 16 milhões de casos de pertússis no mundo todo, resultando em cerca de 195.000 falecimentos de crianças causados pela doença.¹ Em 2012, foram relatados 41.800 casos de coqueluche nos EUA² Estima-se que 3 a 35% das infecções por *Bordetella* são causadas por *B. parapertussis*.^{3,4} A *B. parapertussis* foi identificada durante um estudo de 3 anos em 14 % das amostras como a causa da doença de tosse comprida nos EUA.⁵ Em um estudo realizado na França, a *B. holmesii* foi detectado em cerca de 20% das infecções de *Bordetella* em adolescentes e adultos.⁶

A transmissão da infecção por *Bordetella* ocorre pelas vias respiratórias com gotículas suspensas no ar. Depois de um período de incubação de 7 a 10 dias, o curso clínico da doença decorre através de três estágios: estágio catarral (1 a 2 semanas) com sintomas comuns de resfriado, estágio paroxismal (1 a 2 semanas), caracterizado por paroxismos de várias tosses rápidas seguidas por vômitos, e etapa de convalescência (6 a 10 semanas) caracterizada pelo desaparecimento de tosses com paroxismo.^{7,8}

Em populações com alta cobertura de vacinação de lactentes e crianças, a transmissão da coqueluche continua ocorrendo porque a proteção da vacina dura de 5 a 10 anos, e a proteção após infecção natural diminui após 10 a 15 anos.

Por isto, em populações com alto índice de vacinação, a transmissão da doença ocorre de adolescentes e adultos para lactentes, ou entre pessoas que já não estejam protegidas pela vacina.^{8,9} Um estudo recente sugere a alta de proteção cruzada contra *B. holmesii* após a vacina contra coqueluche.¹⁰

Existem muitos métodos de laboratório disponíveis para o diagnóstico de coqueluche, entre eles, cultura, sorologia e PCR. A cultura é praticamente 100% específica e pode ser de até 50% nas duas primeiras semanas após o início da tosse, sendo reduzida com o tempo. A cultura exige meios especiais e demora no

mínimo uma semana. O diagnóstico de coqueluche por sorologia não é apropriado no estágio inicial da doença.

Os anticorpos podem ser detectados no mínimo duas semanas após a infecção ou a vacina. Como antígeno de teste, é possível usar o ensaio ELISA com toxina de pertússis (PT) ou hemaglutinina filamentosa (FHA). A FHA é composta por todas as espécies de *Bordetella*, enquanto a PT é composta apenas por *B. pertussis*. A PT está contida em todas as vacinas, enquanto a FHA é um componente de muitas vacinas acelulares contra pertússis. Não é possível diferenciar entre a resposta imune contra infecção e a vacina com um ensaio sorológico. A PCR em tempo real permite a detecção rápida, sensível e específica nas 4 primeiras semanas após o início da tosse.

Além disso, a PCR em tempo real permite realizar a diferenciação entre as espécies patogênicas de *Bordetella*.^{8,9}

3. Princípio do teste

RIDA®GENE Bordetella é uma PCR multiplex em tempo real para a detecção direta e qualitativa, e diferenciação de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii* (IS481, IS1001) de zaragatoas e lavados nasofaríngeos.

Após o isolamento de DNA, os fragmentos de genes específicos para *Bordetella pertussis* (IS481), *Bordetella parapertussis* (pIS1001) e *Bordetella holmesii* (IS481, hIS1001) são amplificados (se presentes). Os alvos amplificados são detectados com sondas de hidrólise, que estão marcadas em uma extremidade com um supressor e na outra extremidade com um corante repórter fluorescente (fluoróforo). Na presença de um alvo, as sondas hibridizam para os fragmentos amplificados. Durante a fase de extensão, a Taq-Polymerase quebra a proximidade entre o repórter e o supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE Bordetella contém um Internal Control DNA (ICD) como um monitoramento interno do procedimento de preparação de amostra a fim de determinar a eventual inibição da PCR.

4. Reagentes fornecidos

Tab. 1: Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarelo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	vermelho
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	laranja
N	No Template Control	1x	450 µl	branco
P	Positive Contro	1x	200 µl	azul

5. Instruções de armazenamento

- Proteja todos os reagentes da luz e armazene a -20 °C. Todos os reagentes podem ser usados até ao fim do prazo de validade. Depois de vencido o prazo, a garantia da qualidade já não é válida.
- Descongele cuidadosamente os reagentes antes de usar (por ex., em um frigorífico a 2 – 8 °C).
- Os reagentes podem sustentar até 20 ciclos de congelamento sem influenciar o desempenho do teste (por ex., após o primeiro descongelamento, separe-os em alíquotas e congele-os imediatamente).
- Durante a preparação da PCR, todos os reagentes devem ser conservados a frio de forma adequada (2 – 8 °C).

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste de PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Bordetella é adequado para ser usado com as seguintes plataformas de extração e instrumentos de PCR em tempo real:

Tab. 2: Equipamento necessário

Plataforma de extração:	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Instrumento de PCR em tempo real:	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: No Rotor-Gene Q (QIAGEN), use apenas tubos de 0,1 ml.

Se quiser usar outras plataformas de extração ou instrumentos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm em mdx@r-biopharm.de.

- Cotonetes estéreis livres de meio em nylon floculado (p. ex., Copan Diagnostic Inc., catálogo n.º 552C)

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para executar o LightCycler® 480II e o LightCycler® 480 z

- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos, película)

- Centrífuga com um rotor para tubos de ensaio

- Vortexer

- Pipetas (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)

- Ponteiras de filtro

- Luvas descartáveis sem pó

- Água PCR (água livre de nuclease)

7. Medidas preventivas

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções de realização do teste deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com membranas mucosas ou pele com hematoma. Durante o manuseio de reagentes ou amostras, vista roupa de segurança adequada (luvas, avental de laboratório e óculos de segurança apropriados), e lave as mãos após concluir a realização do teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras ou reagentes estiverem sendo usados.

- A extração, a preparação da PCR e a execução da PCR devem ser separadas em salas diferentes para evitar contaminações cruzadas.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas, bem como todos os reagentes e materiais expostos às amostras, devendo ser manuseados conforme os regulamentos nacionais de segurança.
- Não use o kit após o prazo de validade.

Todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados de modo adequado após o uso. Para o descarte, consulte as normas nacionais relevantes.

Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS) em www.r-biopharm.com.

8. Coleta e armazenamento de amostras

8.1 Preparo das amostras de esfregaços nasofaríngeos

Para isolamento de DNA de cotonetes secos, use o kit de isolamento de DNA disponível (por ex., RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração de DNA (por ex. Maxwell® RSC (Promega)). Extraia o DNA de acordo com as instruções do fabricante.

No isolamento de DNA de zaragatoas nasofaríngeas, é recomendado o seguinte procedimento: Adicione **400 µl de água PCR** em um tubo de preparação; Insira a zaragatoa na água e corte ou quebre a haste da zaragatoa. Feche bem o tubo de preparação, agite em vórtice brevemente e continue conforme a instrução do fabricante do kit de extração de DNA ou do sistema de extração de DNA.

O teste RIDA®GENE Bordetella contém um **Internal Control DNA** que detecta a inibição de PCR, monitora a integridade do reagente e confirma que a extração do ácido nucleico foi suficiente. O **Internal Control DNA** pode ser utilizado como controle de inibição de PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição PCR.

Se o **Internal Control DNA** for usado apenas como controle de inibição de PCR, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control DNA** à mistura principal (consulte a Tab.4).

Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, durante o procedimento de extração, devem ser adicionados 20 µl do **Internal Control DNA**. O **Internal Control DNA** deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente à amostra. Recomendamos também adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR do controle negativo e positivo.

8.2 Preparo das amostras de lavados nasofaríngeos

Para o isolamento de DNA de lavados nasofaríngeos, adicione o volume adequado de acordo com as instruções do fabricante do kit de extração de DNA ou do sistema de extração de DNA.

Para isolamento de DNA de cotonetes secos, use o kit de isolamento de DNA disponível (por ex., RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração de DNA (por ex. Maxwell® RSC (Promega)). Extraia o DNA de acordo com as instruções do fabricante.

O teste RIDA®GENE Bordetella contém um **Internal Control DNA** que detecta a inibição de PCR, monitora a integridade do reagente e confirma que a extração do ácido nucleico foi suficiente. O **Internal Control DNA** pode ser utilizado como controle de inibição de PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição PCR.

Se o **Internal Control DNA** for usado apenas como controle de inibição de PCR, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control DNA** à mistura principal (consulte a Tab.4).

Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, durante o procedimento de extração, devem ser adicionados 20 µl do **Internal Control DNA**. O **Internal Control DNA** deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente à amostra. Recomendamos também adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR do controle negativo e positivo.

9. Realização do teste

9.1 Preparação da mistura principal

Calcule o número total de reações PCR (reações de amostra e de controle) necessárias. Em cada ensaio realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

Recomendamos calcular um volume adicional de 10 % para compensar pipetagens imprecisas (ver Tab. 3, Tab. 4). Antes de usar, descongele, misture cuidadosamente e centrifugue brevemente a **Reaction Mix**, a **Taq-Polymerase**, o

Positive Control], o No Template Control] e o Internal Control DNA]. Mantenha os reagentes frios o suficiente durante a etapa (2 – 8 °C).

Tab. 3: Cálculo e exemplo de pipetagem para 10 reações da mistura principal (ICD como extração e controle de inibição da PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifugue brevemente.

Tab. 4: Cálculo e exemplo de pipetagem para 10 reações da mistura principal (ICD apenas como controle de inibição da PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifugue brevemente.

9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da mistura principal em cada tubo de ensaio (tubo ou placa).

Controle negativo: Adicione 5 µl de No Template Control] à mistura principal pré-pipetada.

Nota: Se o Internal Control DNA] for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do Internal Control DNA] à mistura de PCR do controle negativo.

Amostra: Adicione 5 µl de extrato de DNA à mistura principal pré-pipetada.

Controle positivo: Adicione 5 µl do Positive Control] à mistura principal pré-pipetada.

Nota: Se o Internal Control DNA] for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição

da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR do controle positivo.

Cubra os tubos ou a placa. Centrifugue e coloque no instrumento de PCR em tempo real. A reação de PCR deve ser iniciada de acordo com as definições do instrumento de PCR (ver Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Configuração do instrumento de PCR

9.3.1 Perfil de PCR em tempo real do DNA

Tab. 5: Perfil de PCR em tempo real do DNA para LightCycler® series e Rotor-Gene Q

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Nota: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

Tab. 6: Perfil de PCR em tempo real de DNA para Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Nota: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

9.3.2 Perfil de PCR em tempo real universal

Nota: o perfil de PCR em tempo real universal deve ser utilizado apenas em testes de DNA quando houver a combinação dos testes RIDA®GENE DNA e PCR em tempo real de RNA em uma execução.

Tab. 7: Perfil de PCR em tempo real universal para LightCycler® series

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Nota: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

Tab. 8: Perfil de PCR em tempo real universal para Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Nota: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

9.4 Configuração dos canais de detecção

Tab. 9: Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Indicação
Roche LightCycler® 480II	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	O RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) é necessário
	ICD	533/580	
	<i>B. holmesii</i>	533/610	
	<i>B. parapertussis</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	O RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) é necessário
	ICD	540/580	
	<i>B. holmesii</i>	540/610	
	<i>B. parapertussis</i>	610/670	
ABI 7500	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Verifique se a opção de referência passiva ROX está em nenhum
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Verifique se o corante de referência é nenhum
	ICD	HEX	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	Verde	As configurações de ganho devem ser definidas em 5 de acordo com as configurações padrão
	ICD	Amarelo	
	<i>B. holmesii</i>	Laranja	
	<i>B. parapertussis</i>	Vermelho	

10. Controle de qualidade

A análise das amostras é realizada pelo software do instrumento de PCR em tempo real usado, de acordo com a instrução do fabricante. Os controles positivo e negativo devem mostrar resultados corretos (ver Tab. 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3) para determinar uma execução válida.

O **Positive Control** para *B. pertussis*, *B. holmesii* e *B. parapertussis* tem uma concentração de 10^3 cópias/ μ l. Em cada execução da PCR, ele é usado em um valor total de 5×10^3 cópias.

Tab. 10: Para uma execução válida, é necessário preencher as seguintes condições:

Amostra	Resultado do ensaio	ICD Ct	Gene-alvo Ct
Controle positivo	Positivo	NA *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 Não é necessário um valor de Ct para o ICD para obter um resultado positivo do controle positivo.

Se o controle positivo não for positivo dentro do intervalo de Ct especificado, mas o Controle negativo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se os critérios exigidos não forem preenchidos, os itens a seguir devem ser verificados antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade da instrumentação utilizada
- Desempenho correto de realização do teste

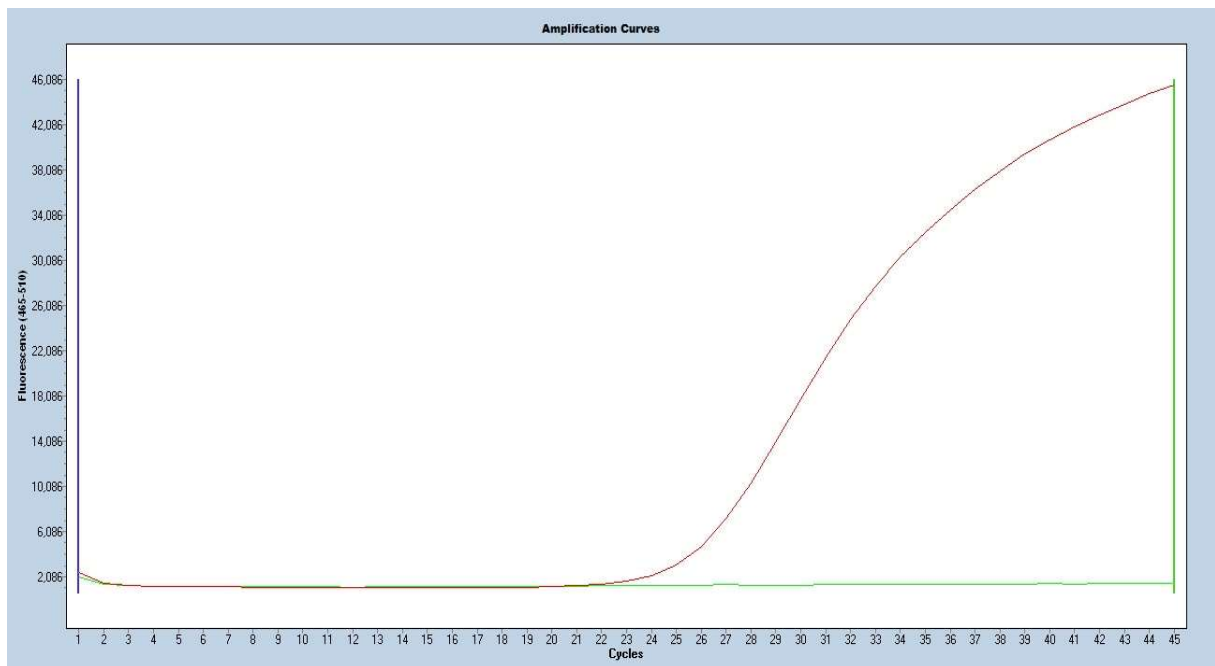


Fig. 1: Execução correta do controle positivo e do controle negativo (*Bordetella pertussis*) no LightCycler® 480II

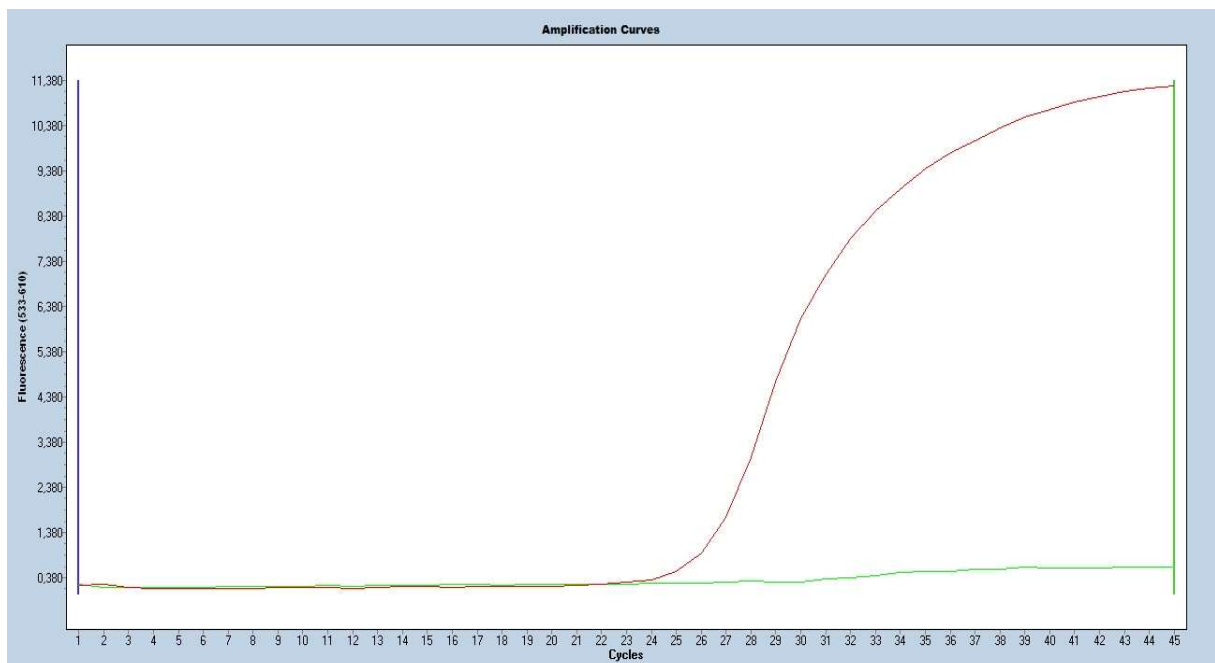


Fig. 2: Execução correta do controle positivo e do controle negativo (*Bordetella holmesii*) no LightCycler® 480II

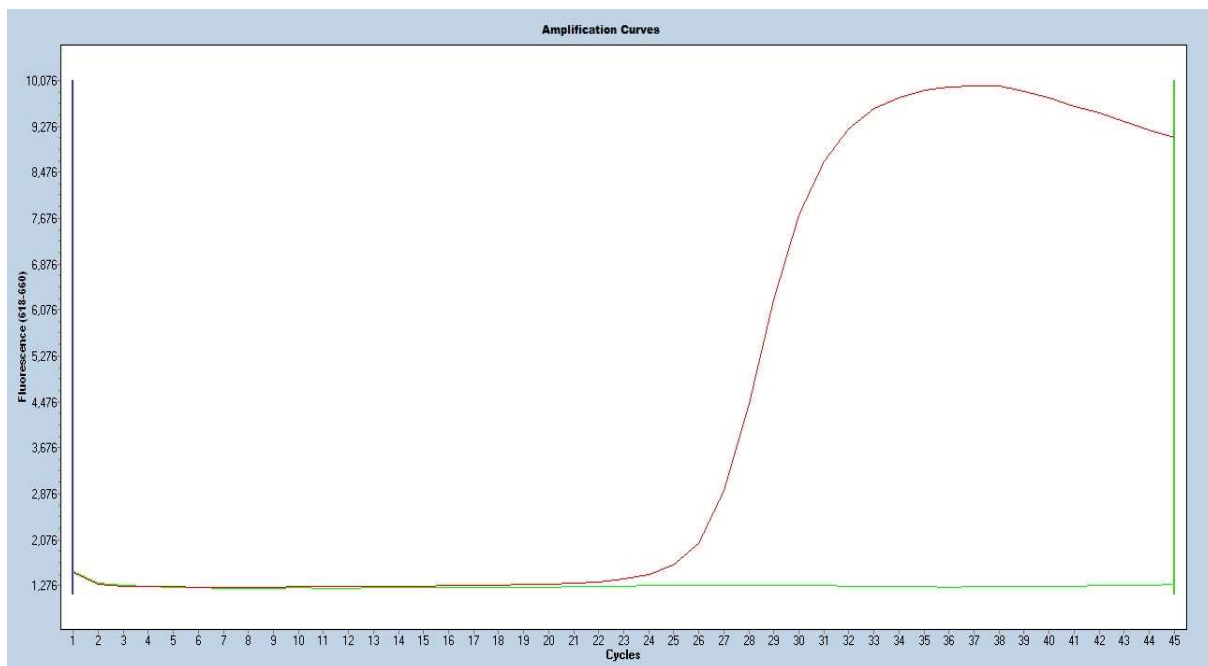


Fig. 3: Execução correta do controle positivo e do controle negativo (*Bordetella parapertussis*) no LightCycler® 480II

11. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tabela 11.

Tab.11: Interpretação das amostras

Genes alvo			ICD	Resultado
<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. parapertussis</i>		
positivo	negativo	negativo	positivo/ negativo	<i>B. pertussis</i> detectado
positivo	positivo	negativo	positivo/ negativo	<i>B. holmesii</i> detectado*
negativo	negativo	positivo	positivo/ negativo	<i>B. parapertussis</i> detectado
negativo	positivo	negativo	positivo/ negativo	Inválido
negativo	positivo	positivo	positivo/ negativo	Inválido
positivo	negativo	positivo	positivo/ negativo	<i>B. pertussis</i> e <i>B.</i> <i>parapertussis</i> detectadas
positivo	positivo	positivo	positivo/ negativo	<i>B. holmesii</i> e <i>B.</i> <i>parapertussis</i> detectadas
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes alvo não detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	Inválido

Nota: *ver também o ponto 8 do capítulo 12: Limitações do método

B. pertussis, *B. parapertussis* ou *B. holmesii* é detectada se a amostra de DNA e o **Internal Control DNA** apresentarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

B. pertussis, *B. parapertussis* ou *B. holmesii* também é detectada se a amostra de DNA apresentar um sinal de amplificação, mas nenhum no **Internal Control DNA** no sistema de detecção. A detecção do controle de amplificação interno não é necessária, porque as altas concentrações do fragmento amplificado podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control DNA**.

B. pertussis, *B. parapertussis* ou *B. holmesii* não é detectada se a amostra de DNA não apresentar um sinal de amplificação, mas sim um sinal de amplificação no **Internal Control DNA** no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção no **Internal Control DNA**.

Uma amostra é inválida, se a amostra de DNA e o **Internal Control DNA** não apresentarem nenhum sinal de amplificação no sistema de detecção. A amostra contém um inibidor de PCR. A amostra extraída precisa ser diluída adicionalmente com água PCR (1:10) e reamplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

12. Limitações do método

1. O resultado da análise molecular não deve levar ao diagnóstico, mas sim ser sempre considerado no contexto do histórico médico e dos sintomas do paciente.
2. Este teste é validado apenas para zangãos e lavados nasofaríngeos em humanos.
3. A coleta, o transporte, o armazenamento e o processamento inadequados da amostra ou uma carga patogênica na amostra inferior à sensibilidade analítica podem resultar em resultados falso negativos.
4. A presença de inibidores de PCR pode causar resultados inválidos.
5. Mutações ou polimorfismos na primeira coleta ou regiões de ligação de sonda podem afetar a detecção de novas variantes, gerando um resultado falso negativo com o teste RIDA®GENE Bordetella.
6. Do mesmo modo que em todos os testes de diagnóstico *in vitro* com base em PCR, é possível detectar os níveis de alvo extremamente baixos, inferiores ao limite de detecção (LoD), mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
7. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. No entanto, um resultado positivo é indicativo da presença do gene-alvo de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii*, respectivamente (IS481, IS1001).
8. No caso de um sinal positivo para *B. pertussis* e *B. holmesii*, uma coinfeção não pode ser descartada devido aos genes alvo detectados.

13. Características de desempenho

13.1 Sensibilidade analítica

A PCR multiplex em tempo real RIDA® GENE Bordetella tem um limite de detecção de ≥ 10 cópias de DNA por reação para *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii*, respectivamente.

As seguintes figuras 4, 5 e 6 apresentam uma série de diluição de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* ($10^5 - 10^1$ cópias de DNA cada por μl) no LightCycler® 480II.

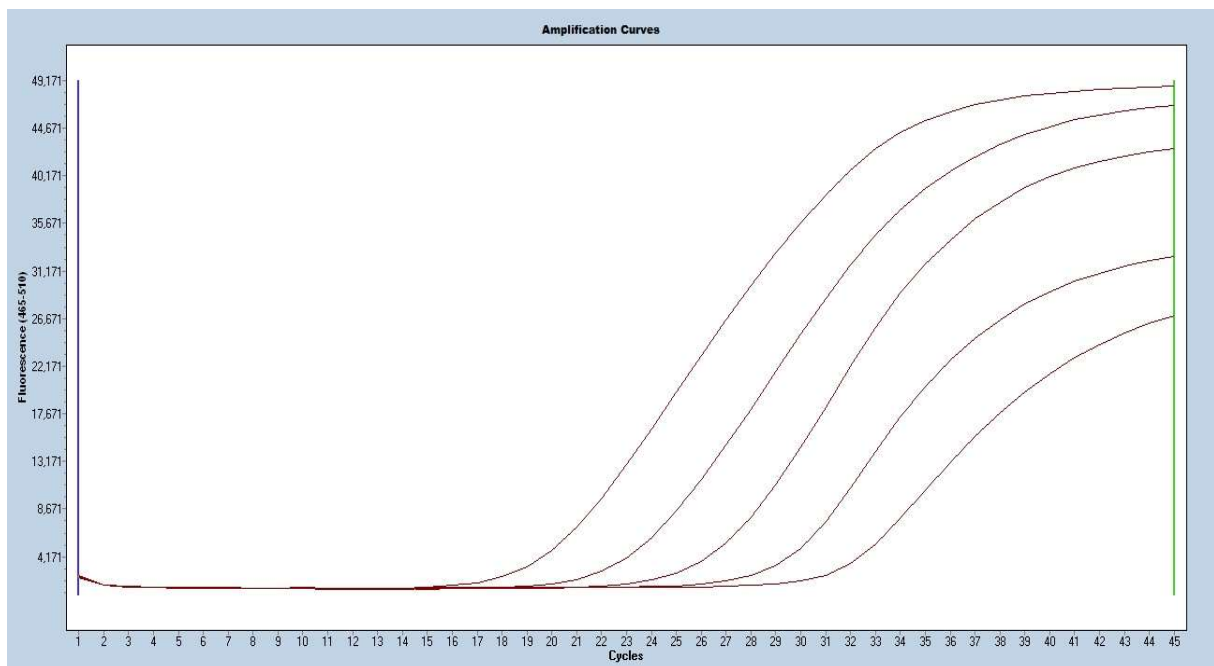


Fig. 4: Séries de diluição de *Bordetella pertussis* ($10^5 - 10^1$ cópias de DNA por μl) no LightCycler® 480II

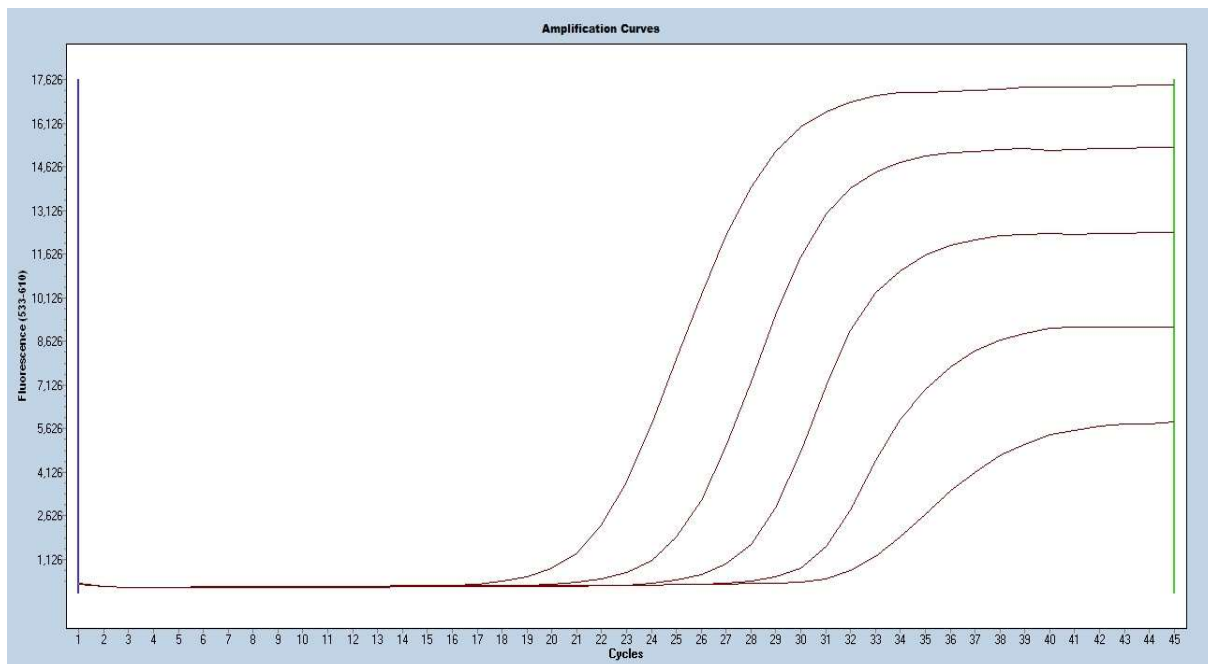


Fig. 5: Séries de diluição de *Bordetella holmesii* ($10^5 - 10^1$ cópias de DNA por μl) no LightCycler® 480II

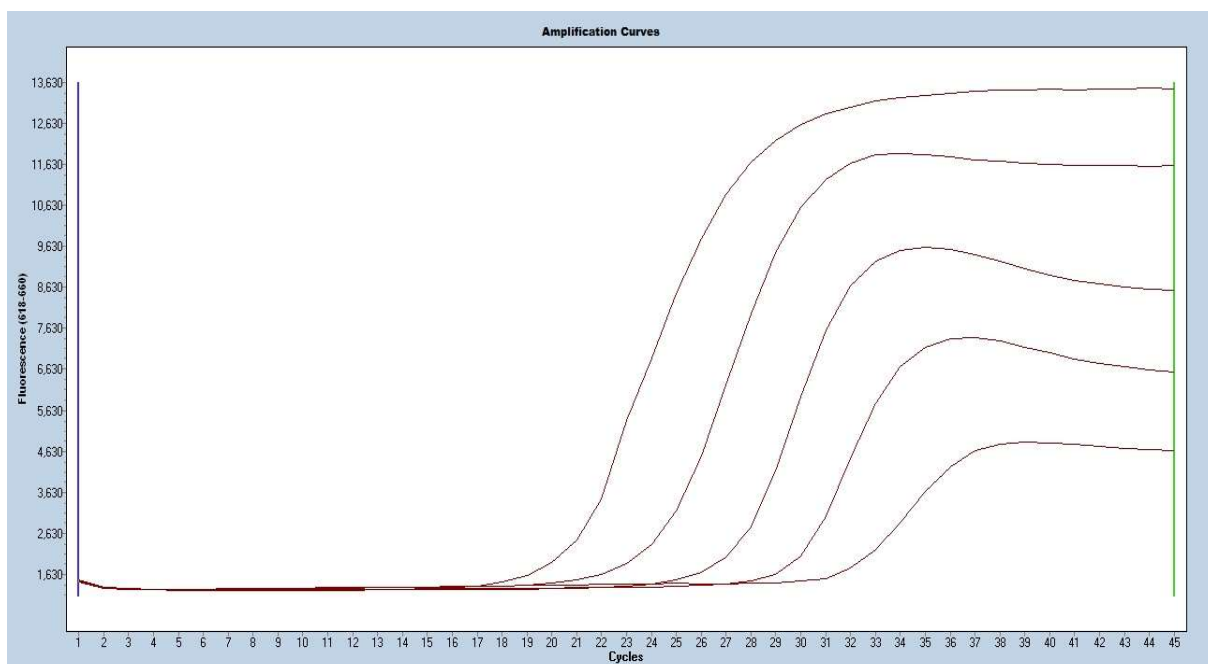


Fig. 6: Séries de diluição de *Bordetella parapertussis* ($10^5 - 10^1$ cópias de DNA por μl) no LightCycler® 480II

O limite de detecção de todo o procedimento depende da matriz da amostra, da extração de DNA e da concentração de DNA.

13.2 Especificidade analítica

A PCR multiplex em tempo real de RIDA®GENE Bordetella é específico para *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmesii* e *Bordetella parapertussis* de zaragatoas e lavados nasofaríngeos em humanos. Não foi detectada nenhuma reação cruzada em relação às seguintes espécies (ver Tab.12):

Tab. 12: Testes de reatividade cruzada










<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Vírus Coxsackie B4, humano	-	Vírus parainfluenza, sorotipo 3	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Cytomegalovirus, humano	-	Vírus parainfluenza 4b, estirpe CH19503, humano	-
Adenovírus 1, humano, estirpe Adenoid 71	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovírus 7, humano, estirpe Gomen	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovírus 40, humano, estirpe Dugan	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Vírus sincicial respiratório, humano, estirpe Long	-
Adenovírus 41, humano, estirpe Tak	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Vírus sincicial respiratório, humano, estirpe 9320	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Rinovírus, humano, genogrupo A	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Vírus Epstein-Barr, estirpe B95-8	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Vírus Herpes Simplex 1, estirpe McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	Vírus Herpes Simplex 2, estirpe MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	Vírus influenza A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , estirpe MGH78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus SM131</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> , subesp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> , subesp. <i>novobiosepticus R22</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , estirpe FH de Eaton Agent	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , estirpe NCTC 7465	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Metapneumovirus, humano</i>	-	Vírus de varicela Zoster (tipo B)	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Neisseria meningitides</i> , estirpe FAM18	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	Vírus Parainfluenza 1, estirpe C35, humano	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Coronavírus 229E, humano	-	Vírus Parainfluenza 2, estirpe Greer, humano	-		

14. Histórico de versões

Número da versão	Capítulo e designação
17/05/2019	3. Princípio do teste 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos 9.4 Configuração dos canais de detecção 11. Interpretação dos resultados 13.2 Especificidade analítica

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número de lote
	Válido até
	Temperatura de conservação
	Referência do produto
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

Não aplicável

16. Literatura

1. World Health Organization 2011. Pertussis. <http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/index.html>. Accessed 21.05.2013.
2. Centers for Disease Control and Prevention 2013. 2012 Provisional Pertussis Surveillance Report. <http://www.cdc.gov/pertussis/downloads/Provisional-Pertussis-Surveillance-Report.pdf>. Accessed 21.05.2013.
3. Linneman CC und Perry EB. *Bordetella parapertussis*. Recent experience and a review of the literature. Am J Dis Child. 1977, 131 (5): 560-563.
4. Mertsola, J. Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. Eur J Clin Microbiol. 1985, 4(2): 123-128.
5. Cherry JD und Seaton BL. Patterns of *Bordetella parapertussis* Respiratory Illnesses: 2008–2010.
6. Njamkepo E et al. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in Nasopharyngeal Samples from French Patients with Suspected Pertussis. Njamkepo E et al. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in J. Clin Microbiol 2011, 49(12):4347-4348.
7. Robert Koch Institut 2013. Pertussis (Keuchhusten). RKI-Ratgeber für Ärzte 2010. Accessed 21.05.2013.
8. Centers for Disease Control and Prevention 2012. Pertussis. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th Edition Second Printing (May 2012). Accessed 21.05.2013.
9. Riffelmann M et al. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. J Clin Microbio. 2005, 43(10): 4925-4929.
10. Zhang X et al. Lack of Cross-protection against *Bordetella holmesii* after Pertussis Vaccination. Emerg Infect Dis 2012, 18(11): 1771-1779.